

感染症学（生体防御分野）

1 構 成 員

	平成23年3月31日現在
教授	0人
准教授	1人
講師(うち病院籍)	0人 (0人)
助教(うち病院籍)	2人 (0人)
助手(うち病院籍)	0人 (0人)
特任教員(特任教授、特任准教授、特任助教を含む)	0人
医員	0人
研修医	0人
特任研究員	0人
大学院学生(うち他講座から)	1人 (1人)
研究生	0人
外国人客員研究員	0人
技術職員(教務職員を含む)	0人
その他(技術補佐員等)	1人
合計	5人

2 教員の異動状況

辻村 邦夫（准教授）（H19.4.1～現職）

内嶋 雅人（助教）（H5.4.1～19.3.31 助手；H19.4.1～現職）

瀬戸 真太郎（助教）（H18.4.1～19.3.31 助手；H19.4.1～現職）

3 研究業績

数字は小数2位まで。

	平成22年度
(1)原著論文数(うち邦文のもの)	5編 (0編)
そのインパクトファクターの合計	12.19
(2)論文形式のプロシーディングズ数	0編
(3)総説数(うち邦文のもの)	1編 (1編)
そのインパクトファクターの合計	0.00
(4)著書数(うち邦文のもの)	0編 (0編)
(5)症例報告数(うち邦文のもの)	0編 (0編)
そのインパクトファクターの合計	0.00

(1) 原著論文（当該教室所属の者に下線）

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Seto S, Tsujimura K, Koide Y: Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. **Traffic** 12: 407-420, 2011.
2. Yamamura Y, Seto S, Uchijima M, Hozumi H, Nagata T, Tsujimura K, Koide Y: Immunogenicity of dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. **Procedia Vaccinology** 3: 19-26, 2010.
3. Eweda G, Suzuki D, Nagata T, Tsujimura K, Koide Y: Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secreted proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine** 28: 4616-4625, 2010.

インパクトファクターの小計 [9.86]

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）

1. Uto T, Tsujimura K, Uchijima M, Seto S, Nagata T, Suda T, Chida K, Nakamura H, Koide Y: A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of heat shock protein 70. **FEMS Immunol Med Microbiol** 61: 189-196, 2011.

インパクトファクターの小計 [2.33]

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

1. Yokoyama N, Ikehara Y, Tiwananthagorn W, Ota N, Igarashi I, Kojima N, Taguchi O, Tsujimura K: Differences in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell-depletion between *Babesia microti* and *Babesia rodhaini* infections in mice. **J Protozool Res** 20: 20-30, 2010.

インパクトファクターの小計 [0.00]

(3) 総 説

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. 込村邦夫, 小出幸夫：結核菌抗原認識とT細胞免疫. 結核 85: 509-514, 2010.

インパクトファクターの小計 [0.00]

4 特許等の出願状況

	平成22年度
特許取得数(出願中含む)	0件

5 医学研究費取得状況

	平成22年度
(1) 文部科学省科学研究費	2件 (190万円)
(2) 厚生科学研究費	0件 (0万円)
(3) 他政府機関による研究助成	0件 (0万円)

(4) 財団助成金	1件 (40万円)
(5) 受託研究または共同研究	0件 (0万円)
(6) 奨学寄附金その他(民間より)	0件 (0万円)

(1) 文部科学省科学研究費

辻村邦夫(代表者) 基盤研究(C) 糖鎖被覆リボソームを利用した抗結核菌ワクチンの開発
70万円(継続)

瀬戸真太郎(代表者) 若手研究(B) 結核菌の食胞形成過程における膜小胞輸送機構のリアルタイムイメージ解析 120万円(継続)

(4) 財団助成金

浜松科学技術研究振興会 内嶋雅人(代表者) タンパク質機能性ドメインと細胞調節因子を用いた動態制御型抗結核菌 ワクチンの開発 40万円

7 学会活動

	国際学会	国内学会
(1) 特別講演・招待講演回数	0件	0件
(2) シンポジウム発表数	0件	1件
(3) 学会座長回数	0件	0件
(4) 学会開催回数	0件	0件
(5) 学会役員等回数	0件	0件
(6) 一般演題発表数	2件	

(1) 国際学会等開催・参加

5) 一般発表

口頭発表

1. Koide Y, Seto S, Tsujimura K: Proteomic analysis reveals the interaction of endoplasmic reticulum with the phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis*. 45th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. July 2010, Cambridge, MA (USA)

ポスター発表

2. Yamamura Y, Seto S, Uchijima M, Tsujimura K, Koide Y: Immune responses against dormancy-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. 45th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. July 2010, Cambridge, MA (USA)

(2) 国内学会の開催・参加

3) シンポジウム発表

1. 瀬戸真太郎, 辻村邦夫, 小出幸夫: イメージ解析とプロテオミクスによる結核菌ファゴソームの分子解剖. 第85回結核病学会総会、2010年6月、京都

8 学術雑誌の編集への貢献

	国内	外国
学術雑誌編集数(レフリー数は除く)	0件	0件

(3) 国内外の英文雑誌のレフリー

Journal of Histochemistry & Cytochemistry (日本) 1回

9 共同研究の実施状況

	平成22年度
(1) 国際共同研究	0件
(2) 国内共同研究	2件
(3) 学内共同研究	3件

(3) 国内共同研究

小島直也(東海大学工学部) 糖鎖被覆リポソームを利用した抗結核ワクチンの開発

池原 譲(産業技術総合研究所) 糖鎖被覆リポソームを利用した抗結核ワクチンの開発

(4) 学内共同研究

小出幸夫(理事) 抗結核ワクチンの開発

永田 年(基礎看護学) 抗結核ワクチンの開発

千田金吾、須田隆文、穂積宏尚(内科学第二) 抗結核ワクチンの開発

10 産学共同研究

	平成22年度
産学共同研究	0件

12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

結核は現在も死因の大きな割合を占め、2009年には世界で940万人が結核を発症し170万人が死亡している。結核菌感染に対するワクチンとしては、BCGが依然として用いられており、世界の人口の約半分が接種を受けている。しかしながら、BCGの乳幼児粟粒結核に対する有効性は確認されているが、成人の肺結核に対する有効性は疑問視されており、より有効なワクチンの開発が急務である。我々は新しい抗結核ワクチンの開発を目的として、有用な結核防御抗原の探索(プロジェクト1および2)と効果的な免疫方法の確立(プロジェクト3)の両面に重点をおいて研究を行っている。

感染した結核菌はマクロファージによって貪食されるが、ファゴソームとリソソームの融合を阻害することによって消化を免れ、細胞内寄生することが知られている。したがって、その阻害機構を明らかにすることは、結核菌に対する免疫応答を考える上で非常に重要な意味を持つ。そこで我々は結核菌を貪食したファゴソームに含まれるタンパク質のプロテオーム解析を行い、その阻害機構の解明を試みている(プロジェクト4)。

1. 休眠期結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発

結核菌が潜伏期に発現する DosR regulon タンパク質を候補抗原として、DNA ワクチン・ライブラリーを作製し、その抗原性を 2 系統のマウスで検討中である。これまでに 32 種類について検討し、C57BL/6 で 10 種類、BALB/c で 13 種類の抗原が T 細胞応答を誘導できた(両系統で誘導できたものは Rv0079、Rv1998c、Rv2031c、Rv2032、Rv2623、Rv2624c および Rv3132c の 7 種類)。同抗原群に対するヒト T 細胞の免疫応答についても検討したところ、一部の活動性結核患者の血中で Rv2031c 特異的な T 細胞の数が増加していることが明らかとなった。これらの結果から、Rv2031c は (2 系統の) マウスおよび (一部の) ヒトで抗原性を持ち、①動物モデルによる実験、②ワクチンへの応用、③活動結核患者の診断等に有用な候補抗原であることが示唆された。

(山村泰弘、穂積宏尚、瀬戸真太郎、内嶋雅人、辻村邦夫、小出幸夫)

2. 結核菌低分子量分泌タンパク質 (CFP11、CFP17 及び TB18.5) のマウス T 細胞エピトープの同定

抗酸菌に由来する分子量約 20 kDa 以下の低分子量分泌タンパク質群は、主要な結核菌抗原であることが知られており、このグループに属する ESAT6 および CFP10 タンパクを用いた QuantiFERON は、ツベルクリン反応に代わる結核菌感染の特異的検査法として注目されている。本研究では、本グループに属し T 細胞免疫誘導能が報告されている CFP11、CFP17 及び TB18.5 について、マウス T 細胞エピトープの同定を行った。その結果、BALB/c マウスでは CFP11、CFP17 及び TB18.5 で各 1 つの CD8⁺ T 細胞エピトープ、C57BL/6 マウスでは CFP11 及び CFP17 で各 1 つの CD8⁺ T 細胞エピトープ、TB18.5 で 1 つの CD4⁺ T 細胞エピトープの存在が明らかとなった。

(Ghada Eweda、鈴木大介、永田 年、辻村邦夫、小出幸夫)

3. タンパク質機能性ドメインを用いた抗結核ワクチンの開発

樹状細胞上のケモカインレセプターを標的とするワクチンでは、MIP-1 α を抗原に融合することで CD8⁺ および CD4⁺ T 細胞を抗原単独のものに比べ強く感作でき、特に CD8⁺ T 細胞を優位に誘導することができた。誘導機構の解析のために、組み換え EGFP、MIP-1 α -EGFP を調製し、骨髓由来樹状細胞による取り込みと細胞内挙動を生細胞で経時解析した。MIP-1 α を融合したものは取り込み速度および効率が高く、CCR5 と共局在していることが明らかとなった。

膜透過性ドメインを抗原ペプチドに付加し、細胞内に取り込ませることで特異的免疫を誘導するワクチンを試みた。Antennapedia の DNA 結合ドメインまたはこれを模した poly-Arg を CD8⁺ T 細胞エピトープペプチドに付加し、蛍光標識したものを樹状細胞に作用させたところ、短時間で効率良く細胞内に取り込まれることが確認できた。また、これらのペプチドをマウスに接種し、免疫誘導能を解析したところ、膜透過性ドメインを付加したペプチドで免疫したマウス脾細胞からのみ、抗原特異的 IFN- γ が産生誘導された。

(内嶋雅人、辻村邦夫、永田 年、小出幸夫)

4. 結核菌ファゴソームに含まれるタンパク質のプロテオーム解析

結核菌ファゴソームの小胞輸送機構の解明をめざし、生化学的に単離した結核菌ファゴソームに含まれるタンパク質のプロテオーム解析を行った。結核菌ファゴソームとラテックスビーズファゴソームからタンパク質を抽出して、2次元電気泳動法によって含有タンパク質の比較を行った。ラテックスビーズファゴソーム画分にはカテプシンなどリソソームに多く含まれるタンパク質が優位を占めていた。結核菌ファゴソーム画分には Grp78 や PDI など小胞体を構成するタンパク質が多数含まれていた。次に結核菌ファゴソーム含有タンパク質の網羅的同定を LC-MS/MS を用いて行った。結核菌ファゴソーム画分には、特異的に Erlin-2 が含まれていることが明らかになった。Erlin-2 ノックダウンマクロファージにおける結核菌増殖の観察結果は、Erlin-2 は結核菌の感染初期におけるマクロファージ内増殖を支持することを示唆した。

(瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫)

13 この期間中の特筆すべき業績、新技術の開発

1. 潜伏期結核菌が発現する蛋白質群の中で、マウスに対して免疫原性を持つものを多数同定した。加えて一部の活動性結核患者の血中で Rv2031c 特異的な T 細胞の数が増加していることを明らかにした (Rv2031c はマウスにおいても抗原性を示す)。
2. 結核菌低分子量分泌タンパク質群 (TB18.5, CFP11 および CFP17) のマウス T 細胞エピトープを同定した。本成果は 1 と合わせ、結核菌 T 細胞抗原の解析、エピトープワクチンの開発に有用な基盤を与えるものである。
3. ケモカインレセプターや膜通過性蛋白質ドメインを利用した新たな分子融合型ワクチン技術を開発した。
4. Erlin-2 が結核菌の感染初期におけるマクロファージ内増殖を支持する可能性を示した。

14 研究の独創性、国際性、継続性、応用性

結核菌防御抗原のマウスおよびヒト T 細胞エピトープの同定は、結核に対するワクチン開発に重要であるのみならず、結核感染の診断ツールとして応用性のあるものである。現在進行中のヒト検体を用いた潜伏期 (休眠期) 抗原に関する包括的検索は、さらに大きな情報をもたらすことが期待できる。また、結核菌抗原の探索と平行して行っている新しいワクチン技術の開発は、同定した結核菌抗原を用いた抗結核ワクチンのみならず、他の感染症やがんに対するワクチン開発にも応用が可能である。

結核菌によるファゴリソーム形成阻害機構の解析から、将来のワクチンや薬剤の開発に有用な知見が得られることが期待できる。